

# 一過性脳虚血後のサル海馬における遺伝子、蛋白および神経幹細胞の発現変化

研究代表者	山嶋 哲盛
雑誌名	平成17(2005)年度 科学研究費補助金 基盤研究(B) 研究成果報告書
巻	2003-2005
ページ	11p.
報告年度	2006-04
研究課題番号	15390432
URL	<a href="http://doi.org/10.24517/00048943">http://doi.org/10.24517/00048943</a>



---

# 一過性脳虚血後のサル海馬における遺伝子、 蛋白および神経幹細胞の発現変化

---

(課題番号：15390432)

平成15年度～平成17年度科学研究費補助金  
(基盤研究(B)) 研究成果報告書

平成18年4月

研究代表者 **山嶋 哲盛**  
(金沢大学大学院医学系研究科・助教授)

金沢大学附属図書館



0800-04238-7

## <はしがき>

近年、ニューロン新生(neurogenesis)は胎児脳のみならず成体脳においても生じていることが明らかになり、種々の脳疾患を治療するための実用的なストラテジーを開発する目的で注目されている。成体脳においては、自己複製能と多分化能を有する**神経系前駆細胞(neural progenitor cells : NPCs)**は世界的に注目され、げっ歯類や鳥類などを用いて多数の研究がなされているが、霊長類の脳を対象とした研究は非常に少ない。

従来の研究からは霊長類と下等哺乳類との間にはかなりの差異があることが明らかになった。種間の差異がNPCsに内在する分子シグナルの差異によるものか、あるいはNPCsをとり巻く微小環境の差異によるものかは現時点では不明である。げっ歯類の成体脳においてはここ3、4年の間にニューロン新生を促進ないし抑制する多数の因子が発見されたが、これらが霊長類の脳においても同様の効果をもたらすか否かは不明である。

ヒトの脳疾患を治療する手法を開発する上で、霊長類に特異的なニューロン新生機構を究明することは不可欠である。本研究では、ニューロン新生にかかわるげっ歯類と霊長類との差異を明らかにすることを目的として、二ホンザルの脳虚血ザルを用いて検索を行った。

## 研究組織

研究代表者 : 山嶋哲盛 (金沢大学大学院医学系研究科 助教授)

研究分担者 : 小川 智 (金沢大学大学院医学系研究科 教授)

## 交付決定額 (配分額)

(金額単位: 円)

	直接経費	間接経費	合 計
平成15年度	3,000,000	0	3,000,000
平成16年度	4,400,000	0	4,400,000
平成17年度	3,900,000	0	3,900,000
総 計	11,300,000	0	11,300,000

## 研究発表

(ア) 学会誌等

- 1: Tonchev AB, Yamashima T, Sawamoto K, Okano H.  
Transcription factor protein expression patterns by neural or neuronal progenitor cells of adult monkey subventricular zone.  
Neuroscience. 2006 Mar 29; [Epub ahead of print]
- 2: Tonchev AB, Yamashima T.  
Differential neurogenic potential of progenitor cells in dentate gyrus and CA1 sector of the postischemic adult monkey hippocampus.  
Exp Neurol. 198(1):101-113, 2006. Epub 2006 Jan 19. PMID: 16426604
- 3: Shimazawa M, Yamashima T, Agarwal N, Hara H.  
Neuroprotective effects of minocycline against in vitro and in vivo retinal ganglion cell damage.  
Brain Res. 1053(1-2):185-194, 2005.
- 4: Tonchev AB, Yamashima T, Sawamoto K, Okano H.  
Enhanced proliferation of progenitor cells in the subventricular zone and limited neuronal production in the striatum and neocortex of adult macaque monkeys after global cerebral ischemia.  
J Neurosci Res. 81(6):776-788., 2005
- 5: Morimoto N, Shimazawa M, Yamashima T, Nagai H, Hara H.  
Minocycline inhibits oxidative stress and decreases in vitro and in vivo ischemic neuronal damage.  
Brain Res. 1044(1):8-15, 2005. Epub 2005 Apr 13.
- 6: Yamashima T, Tonchev AB, Vachkov IH, Popivanova BK, Seki T, Sawamoto K, Okano H.  
Vascular adventitia generates neuronal progenitors in the monkey hippocampus after ischemia.  
Hippocampus. 14(7):861-875, 2004.
- 7: Takahashi N, Tonchev AB, Koike K, Murakami K, Yamada K, Yamashima T, Inoue M.  
Expression of estrogen receptor-beta in the postischemic monkey hippocampus.  
Neurosci Lett. 369(1):9-13, 2004.

- 8: Yamashima T.  
Ca<sup>2+</sup>-dependent proteases in ischemic neuronal death: a conserved 'calpain-cathepsin cascade' from nematodes to primates.  
Cell Calcium. 36(3-4):285-293, 2004. Review.
- 9: Yamashima T, Tonchev AB, Tsukada T, Saido TC, Imajoh-Ohmi S, Momoi T, Kominami E. Sustained calpain activation associated with lysosomal rupture executes necrosis of the postischemic CA1 neurons in primates.  
Hippocampus. 3(7):791-800, 2003.
- 10: Tonchev AB, Yamashima T, Zhao L, Okano HJ, Okano H.  
Proliferation of neural and neuronal progenitors after global brain ischemia in young adult macaque monkeys.  
Mol Cell Neurosci. 23(2):292-301, 2003.
- 11: Popivanova BK, Koike K, Tonchev AB, Ishida Y, Kondo T, Ogawa S, Mukaida N, Inoue M, Yamashima T.  
Accumulation of microglial cells expressing ELR motif-positive CXC chemokines and their receptor CXCR2 in monkey hippocampus after ischemia-reperfusion.  
Brain Res. 970(1-2):195-204, 2003.
- 12: Tonchev AB, Yamashima T, Zhao L, Okano H.  
Differential proliferative response in the postischemic hippocampus, temporal cortex, and olfactory bulb of young adult macaque monkeys.  
Glia. 42(3):209-224, 2003.

(イ) 口頭発表

(国内学会)

1. 山嶋哲盛

Mechanism of Ischemic Neuronal Death and Cosequent Neurogenesis  
Ajou University, Brain Research Institute (Korea) 招待講演、2003.5.15

2. 山嶋哲盛

第26回 日本神経科学大会シンポジウム (名古屋) 2003.7.23-7.25  
「神経変性の分子機構：小胞体からリソゾームへ」

3. 山嶋哲盛  
第26回 日本神経科学大会シンポジウム（名古屋）2003. 7. 23－7. 25  
「我が国における高次脳機能評価の現状」
4. 山嶋哲盛  
Mechanism of Neuronal Death and Neurogenesis  
Shanghai Second Medical University, Brain Research Institute (Shanghai)  
招待講演、2004. 3. 19
5. 山嶋哲盛  
第8回 金沢神経科学会議（金沢）シンポジウム、2003. 10. 12  
「霊長類の虚血脳における神経幹細胞の由来」
6. 山嶋哲盛  
日本眼科学会 専門医制度第39回講習会（名古屋）2003. 11. 1  
「脳外科と神経保護」（教育講演）
7. 山嶋哲盛  
九州大学生体防御研究所セミナー招待講演（中別府雄作教授）  
（福岡、九州大学） 2004. 2. 23  
神経細胞死のメカニズム「カルパインーカテプシン仮説」
8. 山嶋哲盛  
第22回日本脳腫瘍病理学会 教育セミナー（新潟）  
「くも膜顆粒から髄膜腫へ」 2004. 5. 20（教育講演）
9. 山嶋哲盛  
第5回 日本分子脳神経外科学会 口演シンポジウム（東京）  
「虚血サル海馬における神経幹細胞の由来」 2004. 9. 4
10. 山嶋哲盛  
第63回 社団法人日本脳神経外科学会総会 口演シンポジウム（名古屋）  
「血管外膜を利用する脳再生療法の提案」 2004. 10. 8
11. T. Yamashima  
Special Lecture in Medical College of Georgia 2005. 6. 23 (Augusta)  
「Mechanism of ischemic neuronal death and adult neurogenesis」

12. 山嶋哲盛

第28回 日本神経科学大会 公募シンポジウム (横浜)

「神経細胞死におけるカルパインの役割」 2005. 7. 27.

(国際学会)

13. T. Yamashima

国立精神・神経センター COE International Symposium (東京、早稲田大学)

「神経の発生と可塑性」 2004. 3. 5

Mechanism of Neuronal Necrosis: 'Calpain-Cathepsin Hypothesis'

14. T. Yamashima

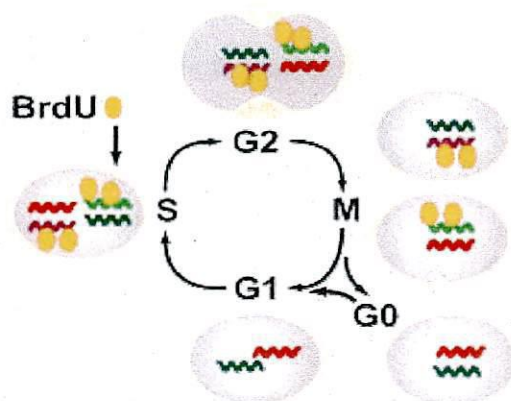
慶応大学国際シンポジウム (東京、慶応大学)

International Symposium on Comparative Study of Hippocampal Functions

「Neuronal necrosis and neurogenesis after ischemia」 2004. 9. 19

## 研究成果（要約）

近年、ニューロン新生 (neurogenesis) は胎児脳のみならず成体脳においても生じていることが明らかになり、種々の脳疾患を治療するための実用的な戦略を開発する目的で注目されている。成体脳においては、自己複製能と多分化能を有する **神経系前駆細胞 (neural progenitor cells : NPCs)** は側脳室前角の脳室下帯 (subventricular zone : **SVZ**) と海馬歯状回の顆粒下層 (subgranular zone of dentate gyrus : **SGZ**) の少なくとも2箇所が存在することが知られている (Gage FH, Science 287:1433-1438, 2000)。脳再生療法を開発するためのツールとして、現在、NPCsは世界的に注目され、げっ歯類や鳥類などを用いて多数の研究がなされているが、霊長類の脳を対象とした研究は非常に少ない。癌末期患者の脳においてBrdUに標識されたNPCsが存在することが1998年に報告されて以来、霊長類を対象とした基礎研究が散発的ではあるがなされている。これらの研究からは霊長類と下等哺乳類との間には定量的にも定性的にも、かなりの差異があることが明らかになった (Kornack DR, Rakic P, Proc Natl Acad Sci USA 96:5768-5773, 1999; Sanai N *et al.*, Nature 427:740-744, 2004)。しかも、本研究成果でこのような差異は健常時よりは脳虚血などの障害を受けた後に顕著になることがわかった (図1)。種間の差異がNPCsに内在する分子シグナルの差異によるものか、あるいはNPCsをとり巻く微小環境の差異によるものかは現時点では不明である。しかし、ヒトの脳疾患を治療する手法を開発する上で、霊長類に特異的なニューロン新生機構を究明することは不可欠である。





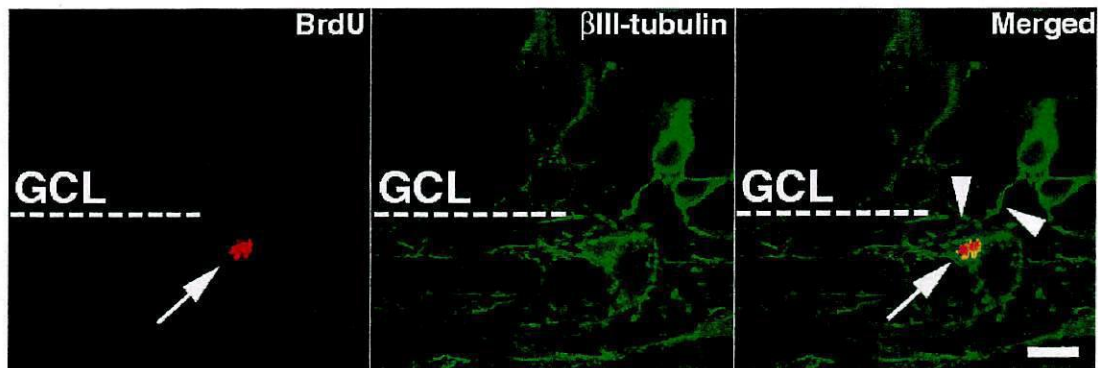


図1 説明：虚血負荷後のサルに thymidine-analogue である BrdU を投与すると DNA を合成している NPCs に取り込まれ、細胞分裂後の娘細胞の核内に残る（上図）。脳を摘出して、抗 BrdU 抗体で免疫染色を行うと（下図）、海馬の歯状回 (GCL) に BrdU 陽性の核（矢印で示す赤色）が見える。幼弱な神経細胞の特異的なマーカーである  $\beta$  III tubulin で 2 重染色をすると、新しく誕生した神経細胞（濃い緑色）の一つは BrdU を取り込んでいる（矢印）。分裂直後の神経細胞と幼弱な神経細胞とはシナプス（矢頭）を作っており、新生細胞がネットワークに integrate されつつあると推定される。

脳虚血後に亢進するニューロン新生に関しては、ここ 4、5 年の間に世界中で百篇単位の論文が発表されているが、その大多数はげっ歯類を対象としたもので、本研究が例外的に霊長類であるニホンザルを対象としたものである。げっ歯類の成体脳においてはここ 3 年程の間にニューロン新生を促進ないし抑制する多数の因子が発見されたが、これらが霊長類の脳においても同様の効果をもたらすか否かは不明である。健常時には霊長類の成体脳はげっ歯類に比し、わずかしかなニューロン新生を示さないことはすでに報告されている。虚血負荷後に亢進するニューロン新生についても、霊長類のそれはげっ歯類に比し著しく少ないことが本研究で明らかとなった（図2）。

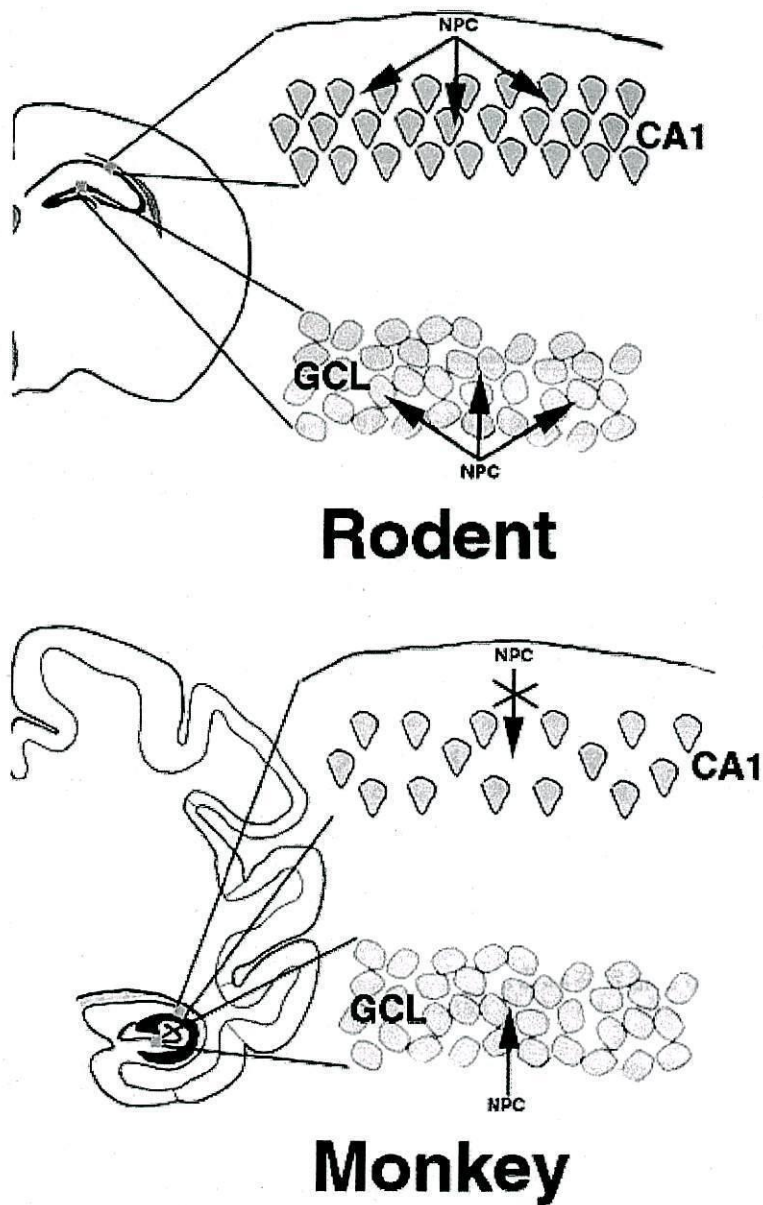


図2説明：一過性全脳完全虚血の負荷後に生じる海馬の神経系前駆細胞(NPC)をネズミ(上)とサル(下)とで比較したもの。サルのCA1においては神経細胞の新生は皆無であるが、歯状回(GCL)においては僅少(1本の矢印で示す)ではあるが神経細胞が誕生している。一方、ネズミにおいてはCA1とGCLのいずれにおいても活発なニューロン新生(計6本の矢印で示す)が見られる。虚血負荷後のニューロン新生はネズミの海馬においてはサルの数倍以上も亢進しており、げっ歯類と霊長類との間には著しい乖離がある。

ニューロン新生に関心を持つ研究者の大部分がげっ歯を対象としている世界的状況の中で、申請者は脳虚血サルを用いて前頁図1のごとく、げっ歯類のニューロン新生と霊長類のそれとの間には著明な差異があることを明らかにした。従来の具体的な研究成果（および、代表的な発表論文）を以下に示す。

- 1) げっ歯類で報告された通り、脳虚血負荷は成体サル海馬の NPCs を増加させる。しかし、その増加度はげっ歯類のおよそ 1/10 であり、NPCs から神経細胞への分化度はげっ歯類のおよそ 1/15 である（**添付論文 1** Tonchev 他：Mol Cell Neurosci 23:292-301, 2003）。
- 2) また、図1で示したごとく、げっ歯類とは異なりサルの側脳室下帯の NPCs は海馬 CA1 において神経細胞に分化することは皆無であった（**添付論文 2** Tonchev 他：Glia 42:209-224, 2003）。すなわち、げっ歯類のデータに基づき、脳室下帯の NPCs を賦活して海馬 CA1 のニューロン新生を促すことは霊長類においては非現実的であると思われた。
- 3) 虚血後のニューロン新生が見られるサル海馬においては、NPCs は脳室下帯ではなく SGZ の血管の外膜に由来していた。しかも、SGZ の血管ニッチェは CA1 とは対照的に成長因子である BDNF や接着因子である PSA-NCAM に富んでいた（**添付論文 3** Yamashima 他：Hippocampus 14:861-875, 2004）。
- 4) 側脳室下帯および嗅球においても脳虚血負荷によって NPCs が増加していたが、これらが新皮質や線状体へと遊走して神経細胞に分化することはほとんど皆無で（**添付論文 4** Tonchev 他：J Neurosci Res 81: 776-788, 2005）、ネズミでの報告とはきわめて対照的であった。
- 5) 同じ脳虚血負荷を受けても、同じサル海馬内にある歯状回と CA1 とを比較すると、ニューロン新生は全くことなる様相を呈した。すなわち、歯状回においては虚血後 7 9 日の時

点においてもニューロン新生がみられたが、CA1 においては虚血後どの時点においてもニューロン新生は皆無であった（添付論文 5 Tonchev & Yamashima : Exp Neurol 198: 101-113, 2006）。

6) 最後に、げっ歯類とサルの内因性シグナルの差異を明らかにした。すなわち、げっ歯類の NPCs およびニューロン前駆細胞は胎児脳のニューロン新生を促す転写因子である Pax6 と Emx2 および Ngn2 を発現している。しかし、サルの SVZ ではこれらの転写因子は NPCs の段階で発現しているのみで、ニューロン前駆細胞においてはこれらの転写因子の発現はみられず、Sox1 や Ngn1、Dlx1/5、Olig3 および Nkx2.2 の発現がみられた（図 3）（添付論文 6 Tonchev 他 : Neuroscience. 2006 Mar 29; [Epub]）。

